

ELI.H.A *Echinococcus*

Dolaylı hemaglütinasyon ile hidatidozun serolojik tanısı

102 tests

(Ref. 66604)

8000140-TR-2026-01_V2

Yalnızca *in vitro* tanı amaçlı, yalnızca profesyonel kullanım içindir.

CE 0459

1 – AMAÇ

ELI.H.A *Echinococcus*, dolaylı hemaglütinasyon yoluyla *anti-Echinococcus granulosus* serum antikorlarının kantitatif tayinini sağlar. **Hedef popülasyon, hidatidoz** şüphesi olan herkesi içerir. Her kit, 102 testin veya 6 seyreltmenin 17 reaksiyonunun gerçekleştirilmesine olanak tanır.

2 – GİRİŞ

Hidatidoz veya kistik ekinokokoz, *Echinococcus* cinsinin bir cestodunun larvaları (hidatid) tarafından neden olunan paraziter bir hastalıktır. *Echinococcus granulosus*'un yaşam döngüsü hem kesin hem de ara konakçılara ihtiyaç duyar. Genel olarak, köpek kesin konakçıdır, koyunlar ve nadir durumlarda insanlar ise ara konakçıdır. Hidatidler en sık karaciğerde (50 ila 70%) ve ardından akciğerlerde (25 ila 40%) bulunur. *E. granulosus* hidatidoz enfeksiyonu, yavaş ve insi bir hastalık seyri ile karakterizedir. Enfeksiyon nispeten asemptomatiktir ve biyolojik tanı esas olarak antikorların saptanmasına dayanır.

3 – PRENSİP

ELI.H.A *Echinococcus*, dolaylı hemaglütinasyon prensibine dayanır.

Duyarılaştırılmış kırmızı kan hücreleri, *Echinococcus granulosus* antijeni ile kaplı koyun kırmızı kan hücrelerinden oluşur.

Anti-Echinococcus granulosus serum antikorlarının varlığı, duyarlı hale getirilmiş kırmızı kan hücrelerinin aglütinasyonuna neden olur ve bu da kuyucuğu kaplayan bulanık kırmızı/kahverengi bir tortu oluşmasına yol açar. Spesifik antikorların yokluğunda, kırmızı kan hücreleri kuyucuğun dibinde halka şeklinde bir tortu oluşturur. Duyarlı hale getirilmemiş kırmızı kan hücreleri, reaksiyonun özgüllüğünü garanti eder ve doğal anti-koyun aglütinlerinin (Forssman heteroantikorları, enfeksiyöz mononükleoz antikorları...) neden olduğu herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır.

Reaksiyon, U-mikroplaka içinde gerçekleştirilir.

Kullanımı basit ve hızlıdır, sonuçlar 2 saat içinde alınır.

4 – REAKTİFLER VE MALZEMELER

Açıklama	Miktar
R1 : 2,2 mL duyarılaştırılmış kırmızı kan hücreleri içeren şişe	1
R2 : 2,2 mL duyarılaştırılmamış kırmızı kan hücresi içeren şişe	1
BUF : 55 mL fosfat tamponu pH 7,2 içeren şişe	1
R3 : 2 mL adsorban şişesi	1
KONTROL + : 0,2 mL titrasyonlu pozitif kontrol şişesi	1
KONTROL - : 0,2 mL negatif kontrol şişesi	1
MIKROPLAKA : U tabanlı mikroplaka	2
DROPPER : özel damlalık	2

5 – ÖNEMLER

- Reaktifler sadece *in vitro* tanı amaçlıdır ve yetkili personel tarafından kullanılmalıdır.

- Reaktifler ve mikroplaka, kutunun üzerinde belirtilen test sayısı kadar kullanılabilir. Mikroplakanın her bir kuyucuğu tek kullanımlıktır.

- BUF reaktifi hariç tüm reaktifler hayvansal kaynaklı hammaddeler içerir ve dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

- Hasta numuneleri potansiyel olarak bulaşıcıdır. Hijyen kurallarına ve kullanım ülkesinde bu tür ürünler için geçerli olan mevcut düzenlemelere uyularak dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

- Reaktifler sodyum azid (konsantrasyon < %0,1) içerir. Reaktiflerde bulunan sodyum azid, borulardaki ağır metallerle reaksiyona girerek patlayıcı bileşikler oluşturabilir. Bu nedenle, reaktifleri lavaboya dökmek ve yürürlükteki atık bertarafı ile ilgili öneri ve düzenlemelere uymak tavsiye edilir.

- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri kullanmayın.

- Farklı parti numaralarına ait reaktifleri kullanmayın.

- Kullanmadan önce hasarlı veya yanlış saklanmış reaktifleri kullanmayın

- Kullanmadan önce serum ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

- Kullanmadan önce R1 ve R2 reaktiflerini dikkatlice çalkalayın.

- R1 ve R2 reaktiflerini dağıtırken, damlalığın tamamen dikey olduğundan emin olun. Sabit dağıtım hacimleri sağlamak için damlalarda hava kabarcığı olmadığından emin olun.

6 – ÖRNEK ALMA VE İŞLEME

Kuru tüplerde kan alındıktan sonra elde edilen taze serum kullanın (2-8°C'de 7 güne kadar veya 7 günden uzun süre saklamak için -20°C'de saklayın) ve hemoliz, bulanıklık, sarılık veya kontaminasyon göstermeyen serum kullanın. Her laboratuvarın, kullanılan toplama tüplerinin uyumluluğunu doğrulaması önerilir. Tekrar tekrar dondurup çözündürmekten kaçının. Serumu bozmayın.

7 – REAKTİFLERİN SAKLANMASI VE HAZIRLANMASI

Reaktifler kullanıma hazırdır.

Reaktifler, orijinal ambalajında ve açıldıktan sonra 2-8°C'de saklandığında, kutunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Dondurulmamalıdır.

8 – GEREKLİ ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEME

- Ölçülecek hacme uygun pipetleme hacmine sahip otomatik pipet(ler);

- Kontamine atık kapları;

- Santrifüj;

- Hemoliz tüpleri.

9 – YÖNTEM

Reaktifleri kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmelerini bekleyin.

9.1 – Numune hazırlama

Test edilecek serumun 1:40 oranında seyreltilmesini sağlayın:

- 50 µL serum;
- 1,95 mL BUF reaktifi.

9.2 – Mikroplaka üzerinde testin gerçekleştirilmesi

- Çok kanallı mikropipet kullanarak, mikroplakanın 8 kuyucuğuna 50 µL BUF reaktifi ekleyin.

- Mikropipet kullanarak, 1. kuyuya 50 µL seyreltilmiş serum ekleyin.

Serumu BUF reaktifiyle karıştırın ve tercihen bir mikrodülatör kullanarak seri seyreltme yapın. Bunun için 1. kuyucuktan 2. kuyucuğa 50 µL, ardından 2. kuyucuktan 3. kuyucuğa 50 µL ve bu şekilde 6. kuyucuğa kadar devam edin. 6. kuyucuktan 50 µL atılır.

Bu şekilde, 1:80 ila 1:2560 arasında seyreltiler elde edilir.

- 7. kuyuya 50 µL seyreltilmiş serum ekleyin.

Serumu BUF reaktifiyle karıştırın ve ardından 50 µL'yi atın.

Bu seyreltme (1:80) serum kontrolüdür ve belirli serum numunelerinde bulunabilecek doğal anti-koyun aglütinlerini tespit etme görevi vardır.

- R1 ve R2 reaktiflerini dikkatlice çalkalayın.

• İlk 6 kuyuya 1 damla R1 reaktifi ekleyin.

• 7. kuyuya (serum kontrolü) 1 damla R2 reaktifi ekleyin.

• BUF ve R1 reaktifinin geçerliliğini kontrol etmekle görevli 8. kuyuya (reaktif kontrolü) 1 damla R1 reaktifi ekleyin.

Not: Her test serisi için yalnızca bir reaktif kontrolü gerçekleştirin.

- Kuyucukların içeriğini çok dikkatli bir şekilde çalkalayın:

• ya da mikroplakanın yan tarafına hafifçe vurarak, mikroplakayı tezgahın üzerine düz bir şekilde yerleştirin;

• veya mikrotitre plakaları için titreşimli plaka çalkalayıcı kullanarak (örneğin 1300 rpm'de 10 saniye boyunca). Orbital çalkalayıcı kullanmayın.

- Ardından plakayı, titreşimden korunacak şekilde, 15 ila 30°C arasında oda sıcaklığında bekletin.

- 2 saat sonra reaksiyonu okuyun. **Sonuçlar en az 1,5 saat ve en fazla 24 saat sonra yorumlanabilir.**

9.3 – Serum kontrolünün aglütinasyonu durumunda doğal anti-koyun aglütinlerinin adsorpsiyonu

- R3 reaktifini dikkatlice çalkalayın.

- Bir tüpün içine şunları ekleyin ve karıştırın:

• 0,1 mL serum;

• 0,3 mL R3 reaktifi.

- Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edin.

- 2000 rpm'de 15 dakika santrifüjleyin.

- Süpernatantı toplayın; serum artık 1:4 seyreltme oranındadır.

- Adsorbe edilmiş stok seyreltme (1:40) elde etmek için süpernatantı BUF reaktifinde 1:10 seyreltin.

- "Mikroplaka üzerinde testin gerçekleştirilmesi" bölümünde açıklanan adımları izleyin, ancak stok seyreltmeyi adsorbe edilmiş stok seyreltme ile değiştirin.

10 – OKUMA

Negatif reaksiyon:

Hemaglütinasyon yok.

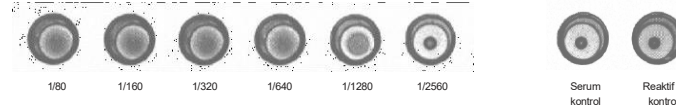
Kuyucuğun dibinde az ya da çok büyük bir halka varlığı.

Pozitif reaksiyon:

Hemaglütinasyon varlığı.

Kuyucuğu kaplayan bulanık kırmızı/kahverengi bir tortu varlığı, bazen ince bir çevresel sınır vardır.

Örnek: 1/1280 seyreltmede pozitif serum.



11 – SONUCLARIN YORUMLANMASI

Titre < 1/160:

Önemli olmayan reaksiyon.

Hidatidozun muhtemelen yokluğu.

Testi 2 ila 3 hafta sonra tekrarlayın ve immüno blotting testi ile birleştirin.

Titre = 1/160:

Şüpheli reaksiyon.

Testi 2 ila 3 hafta sonra tekrarlayın ve immüno blotting testi ile birleştirin.

Titre ≥ 1/320:

İlerleyici hidatidoz lehine önemli reaksiyon. 12 – İÇ KALİTE

KONTROLÜ

CONTROL+ ve CONTROL- reaktifleri test serumları gibi muamele edilmelidir. CONTROL+ reaktifinin titresi, şişe etiketinde yazılı titre ile ± bir seyreltme farkı kadar aynı olmalıdır. CONTROL- reaktifinde herhangi bir hemaglütinasyon olmamalıdır. Hemaglütinasyon varsa test geçerli değildir.

13 – HATALARIN NEDENLERİ VE TEST SINIRLARI

- Serumun kötü muhafaza edilmesi.
- Açıldıktan sonra reaktiflerin kötü muhafaza edilmesi.
- Sadece kitte bulunan damlalıkları kullanın.
- Sadece kitte bulunan, U şeklinde tabanlı plakaları kullanın.
- R1 ve R2 reaktifleri arasındaki damlalıkları birbiriyle değiştirmeyin.
- İlk 6 kuyucukta pozitif reaksiyon görülmesi durumunda, hemaglutinasyonun titre sınırını belirlemek için seri seyreltme işlemini devam ettirin.
- Serum kontrolü negatif reaksiyon (halka) vermemelidir. Bu kontrolün hemaglutinasyon durumunda, adsorpsiyon yoluyla serumdan doğal anti-koyun aglutininleri ortadan kaldırdıktan sonra testi yenilemek gerekecektir.
- Reaktif kontrolü negatif reaksiyon (halka) vermemelidir. Bu kontrolün hemaglutinasyon durumunda, **ELI.H.A Echinococcus** kiti kullanılamaz.
- Antikor konsantrasyonu çok yüksek olan bazı serumlar, ilk seyreltmelerde bir bölge fenomenine (bulanıklığın kaybolmasıyla birlikte) neden olabilir, ancak bu fenomen sonraki seyreltmelerde kaybolur.
- Reaktiflerin kalitesi, mikropoların hiçbir şekilde hareket ettirilmemesi ve herhangi bir titreşim kaynağından korunması koşuluyla, reaksiyonun akşam saatlerinde gerçekleştirilmesini ve testin ertesi sabah okunmasını mümkün kılar.
- Test yapmak için kullanılmış bir kuyuyu tekrar kullanmayın.
- Tıbbi biyoloji prosedürleri için Fransız terminolojisi, ekinokokkozun serolojik taraması için *anti-Echinococcus* antikorlarının aranmasının iki farklı teknik kullanılarak gerçekleştirilmesi gerektiğini belirtir. Bunun amacı, bilinmeyen herhangi bir müdahaleyi ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle, bu serolojinin genel yorumlanması, kullanılan farklı tekniklerin sonuçlarına dayandırılmaldır. Her durumda, nihai tanı konulmadan önce klinik, epidemiyolojik ve biyolojik verilerin tam olarak dikkate alınması gerekir.
- Mikropalakayı hareket ettirmeden veya titreştirmeden, test akşam saatlerinde yapılabilir ve ertesi sabah (yani maksimum 24 saatlik reaksiyon süresinden sonra) okunabilir.

14 – PERFORMANS

14.1 – ANALİTİK PERFORMANS

14.1.1 – Tekrarlanabilirlik

Pozitif serumda, cihaz bir kuyucuk farkı kabul edilebilir toleransla %100 tekrarlanabilirliğe sahiptir. Negatif serumda, cihaz sonuçta pozitiflik toleransı olmadan %100 tekrarlanabilirliğe sahiptir. Serum kontrolü ve reaktif kontrol kuyucukları %100 tekrarlanabilirliğe sahiptir.

14.1.2 – Tekrarlanabilirlik

Pozitif serumda, cihaz bir kuyucuk farkı kabul edilebilir toleransla %100 tekrarlanabilirliğe sahiptir. Negatif serumda, cihaz sonuçta pozitiflik toleransı olmaksızın %100 tekrarlanabilirliğe sahiptir. Serum kontrolü ve reaktif kontrol kuyucukları %100 tekrarlanabilirliğe sahiptir.

14.1.3 – Girişim

Echinococcus türleri olan *E. multilocularis* ve *E. granulosus* arasında yüksek genetik homoloji olması nedeniyle, çapraz reaktiviteyi dışlamak için ikincil testler gereklidir (9).
Anti-Fasciola antikorları veya *anti-S. mansoni* antikorları için pozitif numunelerde çapraz reaksiyonlar gözlemlenmiştir (2). Toksoplazmoz, HIV, EBV, aspergilloz, filariyaz ve klonorkiyaz hastalarından alınan numunelerde çapraz reaksiyonlar gözlemlenmiştir (1,3).

Hemogloblin, lipitler ve bilirubin ile olası etkileşimler CLSI EP07 önerileri (4,5,6,7,8) doğrultusunda incelenmiştir. Aşağıdaki maksimum konsantrasyonlara kadar önemli bir etkileşim saptanmamıştır:

Test edilen maddeler	Maksimum konsantrasyonlar
Bilirubin	800 mg/L
Lipidler	15 g/L
Hemoglobin	10 g/L

Kapsamlı bir literatür taraması, potansiyel ilaç etkileşimlerini ortadan kaldırmamızı ve henüz tanımlanmamış herhangi bir etkileşimle ilişkili riski mümkün olduğunca azaltmamızı sağladı.

14.2 – KLİNİK PERFORMANS

ELI.H.A Echinococcus, *Echinococcus granulosus* antijeni ile duyarlı hale getirilmiş kırmızı kan hücrelerinden oluşur. Reaksiyonda duyarlılık ve özgüllük sağlar. 221 insan serumu üzerinde yapılan bir çalışmada, %93,0 duyarlılık (kist konumuna bakılmaksızın) ve %94,9 özgüllük gösterilmiştir. IFI ve ELISA testleri ile yapılan karşılaştırmalar, bu farklı reaksiyonlar arasında dikkate değer bir tamamlayıcılık olduğunu göstermiştir (1).

ELI.H.A Echinococcus kitinin klinik performansı, 2009 ile 2023 yılları arasında yayınlanan beş yayına dayanan bilimsel literatürün incelenmesi ile değerlendirilmiştir (2,10,11,12,13). Aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

Tablo 1: 1/160 eşik değeri için klinik performans

Çalışma	Çalışma n°4 [12]
Yayın yılı	2023
Popülasyon	Kistik ekinokokkoz şüphesi olan hastalardan alınan 23 serum
Karşılaştırmalı yöntem (referans standardı)	Histopatolojik inceleme
Duyarlılık 1/160	94% ^a
Özgüllük 1/160	100% ^a
PPV* 1/160	100% ^a
NPV* 1/160	85,7% ^a

Tablo 2 ve 3: 1/320 eşik değeri için klinik performans

Çalışma	Çalışma n°1 [10]			Çalışma no. 2 [11]	Çalışma no. 3 [2]		
Yayın yılı	2009			2024	2010		
Popülasyon	Akoğer hidatik kistli hastalardan alınan 19 serum	Parazitloz ve diğer pulmoner hastalıkları olan hastalardan alınan 40 serum	Sağlıklı kişilerden alınan 20 serum	Kistik ekinokokkoz şüphesi olan hastalardan alınan 74 serum (3 ila 86 yaşları arasında 51 kadın ve 23 erkek)	Kistik ekinokokkoz hastalarından alınan 30 serum ve başka parazit enfeksiyonu olmayan hastalar	30 diğer parazitloz hastalarından alınan serum, <i>S. mansoni</i> (n=6), <i>Fasciola</i> (n=6), <i>H. nana</i> (n=6), <i>E. histolytica</i> (n=6) ve <i>Giardia lamblia</i> (n=6).	Parazitloz bulunmayan hastalardan alınan 10 serum
Karşılaştırmalı yöntem (referans standardı)	Çalışma sonuçları	NA	NA	Klinik ve radyolojik raporların sonuçları	Klinik analiz ve cerrahi	NA	NA
Duyarlılık 1/320	73,6			70,8	86,7		
Özgüllük 1/320	98,3			96,2	%		
PPV* 1/320	93,3			97,1	%		
NPV* 1/320	92,1			64,1	90,5		

Çalışma	Çalışma n°4 [12]	Çalışma n°5 [13]		
Yayın yılı	2023	2016		
Popülasyon	Kistik ekinokokkoz şüphesi olan hastalardan alınan 23 serum ekinokokkoz	18 kistik ekinokokkozlu çocuklardan alınan serum	Kistik ekinokokkozlu yetişkinlerden alınan 27 serum	Sağlıklı deneklerden alınan 20 serum
Karşılaştırmalı yöntem (referans standardı)	Histopatolojik inceleme	Klinik inceleme ve tıbbi görüntüleme		
Duyarlılık 1/320	82,4% ^a	88,9% ^a		
Özgüllük 1/320	100% ^a	100% ^a		
PPV* 1/320	100% ^a	100% ^a		
NPV* 1/320	66,7% ^a	80% ^a		

*: PPV: Pozitif Öngörü Değeri
*: NPV: Negatif Öngörü Değeri
^a : ELITech Microbio tarafından hesaplanan değer

Bilimsel literatürde, 1/160 anlamlılık eşiği için klinik duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %94 ve %100'dür. 1/320 anlamlılık eşiği için klinik duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %73,6 ile %88,9 ve %95 ile %100 arasında değişmektedir. 1/160 anlamlılık eşiği için PPV %100 ve NPV %85,7'dir. 1/320 anlamlılık eşiği için PPV %92,86 ile %100 arasında, NPV ise %66,67 ile %92,1 arasında değişmektedir.

15 – ATIKLARIN ORTADAN KALDIRILMASI

Atıklar, kullanım ülkesinde bu tür ürünler için geçerli hijyen kuralları ve mevcut yönetmeliklere uygun olarak bertaraf edilmelidir. BUF reaktifi dökülürse, çalışma alanını emici kağıtta temizleyin ve suyla durulayın. Çalışma alanına başka bir reaktifin serumu dökülürse, çamaşır suyu ve emici kağıt kullanarak temizleyin.

16 – KAYNAKÇA

1. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - Hidatidozun serolojik tanısında dolaylı hemaglutinasyon. Dolaylı immüno floresan ve ELISA tekniği ile karşılaştırma - Lyon Médical, 1979, 241, 755-759.
2. El-Shazly AM, Saad RM, Belal US, Sakr T, Zakae HA. İnsan hidatidozunun kanıtlanmış vakalarının serolojik tanısında ELISA ve IHAT'ın değerlendirilmesi. J Egypt Soc Parasitol. 2010;40(2):531-538.
3. Van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, et al. Ticari dolaylı hemaglutinasyon testi ile ithal kistik ekinokokkozun güvenilir serolojik tanısı. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(4):409-412.
4. Lo SY, Saifee NH, Mason BO, Greene DN. Standart olmayan vücut sıvıları ile boşlukları doldurmak. Pract Lab Med. 16 Mart 2016; 5:24-31. doi: 10.1016/j.plabm.2016.03.003. PMID: 28856201; PMCID: PMC5574517.
5. CLSI. Klinik Kimyada Girişim Testi. 3. baskı. CLSI kılavuzu EP07. Wayne, Pa: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü; 2018. s. 23-24
6. CLSI. Klinik Kimyada Girişim Testleri için Ek Tablolar. 1. baskı. CLSI eki EP37. Wayne, Pa: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü; 2018. s. 94-96
7. Yenidoğan hiperbilirubinemi - Pediatri - MSD El Kitabı Profesyonel Baskısı § Yenidoğan hiperbilirubinemi etyolojisi s. 5 (msdmanuals.com)
8. Bilirubin - Biyolojik normlar - IFSI Kursu - IDE Dosyaları Şikri p3 varlığı (fiches-ide.fr)
9. Schwarz NG, Loderstaedt U, Hahn A, et al. İhmal edilen zoonotik hastalıkların (NZDs) mikrobiyolojik laboratuvar tanısı. Acta Trop. 2017;165:40-65. doi:10.1016/j.actatropica.2015.09.003
10. Eris FN, Akisu C, Aksoy U. Pulmoner hidatik hastalığın serolojik tanısı için iki ELISA ve iki dolaylı hemaglutinasyon testinin değerlendirilmesi. Korean J Parasitol. 2009;47(4):427-429. doi:10.3347/kjp.2009.47.4.427
11. Erganis, S., Sarzhanov, F., Al, F.D. ve ark. Kistik Ekinokokkozun Serolojik Tanısında Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Acta Parasit.* **69**, 1122–1131 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11686-024-00840-z>
12. Yülek Ö, Genç Bahçe Y, Demir H. Kistik ekinokokkoz tanısında dolaylı hemaglutinasyon testinin önemi: Serolojik-histopatolojik korelasyon. Cerrahpaşa Med J. 2023;47(2):129-134.
13. El-Ghareeb AS, Waked NM, Al-Feky HM. HASTANEDE YATAN ÇOCUK VE YETİŞKİNLERDE AKCİĞER VE KARAÇİĞER HİDRATİT KİSTLERİ ÜZERİNE KLİNİK VE PARAZİTOLOJİK ÇALIŞMALAR. J Egypt Soc Parasitol. 2016;46(1):9-18. doi:10.12816/0026145

Cihazla ilgili herhangi bir ciddi olay, üreticiye ve kullanıcının bulunduğu üye devletin yetkili makamına bildirilmelidir.

Önceki sürümden yapılan değişiklikler gri renkle vurgulanmıştır.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES-France
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
<http://www.elitechgroup.com>

